Aus dem Institut für Pathologie
des Universitätsklinikums Charlottenburg
der Freien Universität Berlin
Ärztl. Direktor: Prof. Dr. S. Blümcke

UNTERSUCHUNGEN CHRONISCHER ORGANSCHÄDEN AN LEBER UND MILZ NACH ANWENDUNG PERFLUORIERTER KOHLENWASSERSTOFFE (FLUOROKARBONE; FLUOSOL-DA 20 %) IM TIEREXPERIMENT AN RATTEN

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Manfred Lutz
aus Heilbronn

1985

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549615_0069

Aus dem Institut für Pathologie
des Universitätsklinikums Charlottenburg
der Freien Universität Berlin
Ärztl. Direktor: Prof. Dr. S. Blümcke

UNTERSUCHUNGEN CHRONISCHER ORGANSCHÄDEN AN LEBER UND MILZ NACH ANWENDUNG PERFLUORIERTER KOHLENWASSERSTOFFE (FLUOROKARBONE; FLUOSOL-DA 20%) IM TIEREXPERIMENT AN RATTEN.

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Manfred Lutz
aus Heilbronn

Referent: Prof.Dr. S. Blümcke
Korreferent: Prof. Dr. C. J. Lüders

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der Freien Universität Berlin

promoviert am: 28.5.1985

A. Einführung

I. Überblick über den bisherigen Stand der Forschung

II. Ausgangspunkt der eigenen Untersuchungen

III. Ziel und Hypothese der Untersuchungen

B. Material und Methode

I. Substanz und Versuchstiere

II. Statistische Methodik

III. Versuchsablauf

IV. Hydroxyprolinmethode

V. Blutserumuntersuchungen

VI. Histologische Untersuchungen

C. Ergebnisse

I. Leber

1. Bindegewebsbestimmung

2. Blutserumuntersuchungen

3. Histologische Untersuchungen

II. Milz

1. Bindegewebsbestimmung

2. Histologische Untersuchungen

D. Diskussion

E. Zusammenfassung

F. Literatur

G. Danksagung

H. Lebenslauf

A. Einleitung

I. Überblick über den bisherigen Stand der Forschung

Perfluorierte Kohlenwasserstoffe (PFC = Perfluorochemicals) besitz eine reversible Bindungsfähigkeit für Gase wie O_2, CO_2, NO_2 u CO. Die Anwendung solcher Substanzen als Erythrozytenersatz, d. h. a sauerstofftransportierende Medien in der Biologie und Medizin, sind G genstand der Forschung seit 1966 (CLARK und GOLLAN 1966, SLOVITER u KAMIMOTO 1967 u.a.m). In der Folgezeit entwickelte sich eine sehr i tensive Forschungstätigkeit, die ihre Höhepunkte in mehreren Symposi fand. Die Berichte (Zitierweise in Klammern) von den jeweiligen Symp sien fassen die Ergebnisse zusammen. Es sind dies:

1. 2nd Intercompany Conference on Fluorocarbon Osaka, Japan 1973 (Pr II. Intercomp Conf on Fluorocarbon)

2. Xth International Congress of Nutrition, Kyoto 1975; Post Congre Symposion on Perfluorochemical artificial blood (Proc Post Congr Sy on PFC Artificial Blood)

3. HS Symposion of Research on Perfluorochemicals in Medicine a Biology, Karolinska Institute Research Center, Huddinge (Schweden) 19 (HS Symp Res on PFC in Med and Biol)

4. 4th International Symposion on Perfluorochemical Blood Substitut Kyoto 1978 (Proc 4th Int Symp on PFC Blood Substitutes)

5. 5th International Symposion on Perfluorochemical Blood Substitut Mainz 1981 (5th Int Symp on PFC Blood Substitutes)

6. International Symposion on Advances in Blood Substitute Researc San Francisco 1982 (Progr Clin and Biol Res 122).

Die Fluorocarbone sind synthetisch gewonnene, wasserunlösliche, biologisch und chemisch inerte Verbindungen. Aufgrund ihrer Wasserunlöslichkeit sind sie nur als Emulsionen parenteral anwendbar. Standardisiert verfügbare Emulsionen sind die Fluosole^{R} (Fluosol 43, Fluosol-DA 20% und Fluosol-DA 35%*). Die in der vorliegenden Arbeit dargelegten Untersuchungen wurden ausschließlich mit Fluosol-DA 20% durchgeführt. Die Zusammensetzung der Emulsion ist in Tabelle 1 widergegeben.

Tabelle 1: Zusammensetzung und Funktion der Komponenten des Fluosol-DA 20% (mod. n. GEYER, 1982)

Bestandteil	Funktion	Menge (Gew/Vol%) Fluosol-DA 20%
Perfluorodecalin	O_2 und $C0_2$-Transport	14.0
Perfluorotripropylamin	″	6.0
Pluronic F-68	Emulgator und kolloidosmotischer Druck	2.7
Eilezithine	″	0.4
Glyzerin	onkotischer Druck	0.8
NaCL	essentielle Ionen	0.6
KCl	″	0.034
$MgCl_2$	″	0.02
$CaCl_2$	″	0.028
$NaHCO_3$	Pufferkapazität	0.21
Glukose	Energielieferant	0.18
Hydroxyäthylstärke	Viskosität und kolloidosmotischer Druck	3.0

* Hersteller: Green Cross Corporation 15/1 Imabashi 1, Chome Higashi-Ku, Osaka, Japan
Vertrieb in Deutschland: Firma J. Pfrimmer & Co, 8500 Erlangen, Hofmannstr. 27

In Fluosol DA 20% sind Perfluorodecalin und Perfluorotripropylamin im Verhältnis 7:3 kombiniert. Das Molekulargewicht dieser Fluorocarbone liegt zwischen 450 und 550.

Das Fluosol-DA 20% hat sich als Kandidat für eine mögliche parenterale Anwendung deshalb herauskristallisiert, weil hier eine befriedigende Emulsionsstabilität vorliegt. Die Verweildauer der Fluorocarbone im Organismus ist verschieden lang. Das Perfluorodecalin (FDC) hat eine Halbwertzeit von etwa 7 Tagen, Perfluorotripropylamin (FTPA) von 65 Tagen (NAITO und YOKOYAMA 1977 und 1981). Von dieser Substanz ist die parenterale Anwendung bis zu 4 g PFC-Substanzen/kg Körpergewicht (KG) vorgesehen. Dies entspricht 20 ml Fluosol-DA 20%/kg KG oder 2 - 3 Infusionen zu je 500 ml bei einem Erwachsenen.

(Die Anwendung des Fluorocarbons-43 im Fluosol-43 für die parenterale Applikation ist nicht zu empfehlen, da die Halbwertzeit hier weit über 300 Tage beträgt. Die systemische Anwendung des Fluosol-DA 35% bringt keine Vorteile, da die Viskosität der Substanz erhöht ist (vgl. Tab.2).

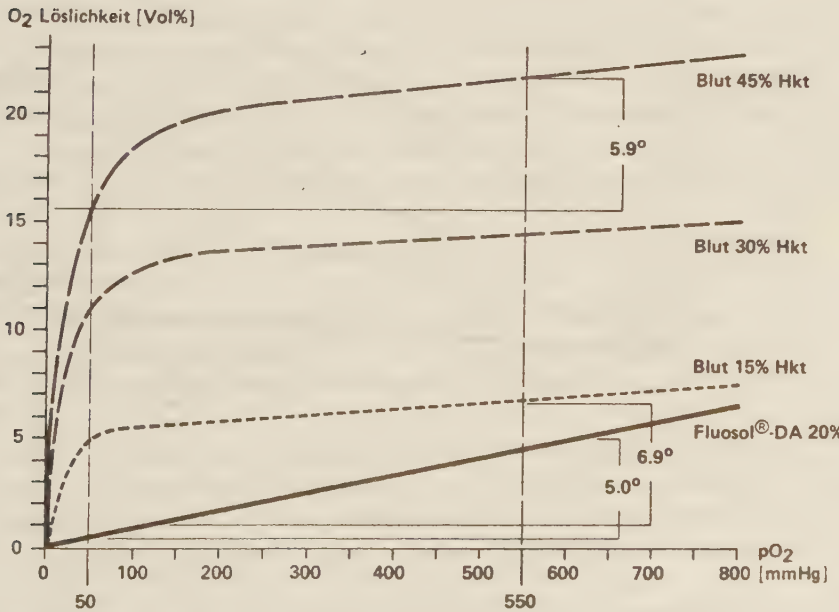
Tabelle 2: Charakteristik und Anwendungsbereich der Fluosole^{R}
(mod. aus PFANNKUCH 1983)

Fluosol-43 :	gute Emulsionsstabilität; sehr lange Verweildauer im Organismus (Halbwertzeit ca. 900 Tage)
	Organperfusion (modifiziert als Oxypherol^{R} im Handel)
Fluosol-DA 20% :	befriedigende Emulsionsstabilität; kurze Verweildauer des FDC, längere des FTPA im Organismus
	parenterale Anwendung bis zu 4 g PFC-Substanzen/kg Körpergewicht ist vorgesehen (entspr. etwa 2-3 Infusionen bei einem Erwachsenen). Die vorgelegten eigenen Untersuchungen beziehen sich auf diese Präparation
Fluosol-DA 35% :	erhöhter Anteil an PFC-Substanzen bei gleicher Zusammensetzung der Emulsion; erhöhte Viskosität; bei Applikation gleicher Volumina wird fast die doppelte Menge Substanzen zugeführt bzw. gespeichert als beim Fluosol-DA 20%
	Extremitäten-/ Organperfusion; Oxygenatoren

Die Emulsion ist des weiteren charakterisiert durch ihre mit dem Blutserum isoonkotischen Eigenschaften, die vom Emulgator Pluronic F 68 einerseits und einem Anteil von Hydroxyaethylstärke andererseits gewährleistet werden (vgl. Tab.: 1).

Die Sauerstoffbindung an das Fluosol erfolgt rein physikalisch, und die Sauerstoffbeladung erfolgt linear, abhängig vom pO_2. Während unter atmosphärischen Bedingungen 100 ml Blut etwa 20 ml Sauerstoff binden können, bindet der Fluosolkomplex etwa 6 ml O_2/100 ml Blut unter der Voraussetzung, daß die inspiratorische O_2-Konzentration ca. 80% beträgt. Das bedeutet, daß ein sauerstofftransportierender Effekt nur bei Erhöhung des inspiratorischen Sauerstoffangebotes zu erwarten ist.

Abb. 1



O_2-Dissoziationskurve für Vollblut (modifiziert nach NAITO und YOKOYAMA 1981).

Für CO_2 ist die Transportkapazität des Fluosols 3–4 mal größer als für O_2. Auch die Bindungskurve verläuft linear.

(Abb. 2)

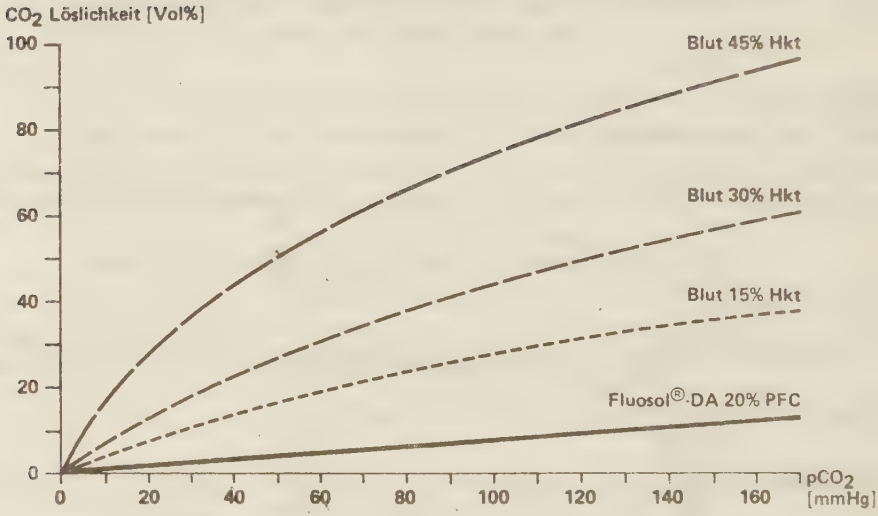


Abb. 2

CO_2-Dissoziationskurve für Vollblut (modifiziert nach NAITO und YOKOYAMA 1981)

Als mögliche Anwendungsgebiete der Fluorocarbone faßt GEYER (1975) zusammen:

1. Anämien unterschiedlicher Genese, z. B. aplastische Anämie, Sichelzellerkrankungen, hämolytische Anämie und Anämien als Folge von Tumorerkrankungen
2. anaerobe Infektionen, z. B. Tetanus, Gasbrand
3. Blutverlust in der Chirurgie, u. a. bei extrakorporaler Zirkulation und in hämorrhagischen Notfällen,
4. Schock zur Verbesserung der Mikrozirkulation,
5. Gefäßverschlüsse nach Thrombosen, bei Arteriosklerose und nach Herzinfarkt,
6. adjuvant in der Chemo- und Immunotherapie bei malignen Erkrankungen,
7. Auswaschen von Toxinen, Viren, Drogen,
8. isolierte Organperfusion in situ,
9. Entfernung von Antikörpern vor Organtransplantationen,
10. Kohlenmonoxydvergiftung,
11. transbronchiale Anwendung zur Verhinderung der Dekompressionserkrankungen bei Tauchern und Raumfahrern,
12. experimentelle Medizin mit "blutfreier" Zirkulation.

Limitierende Faktoren des Einsatzes von Fluosolen in größerem Umfange sind:

1. Die Emulsion ist in tiefgekühltem Zustand (-25°C) zu transportieren und zu lagern, und
2. die Substanzen verweilen zu lange im Organismus.

(Neue Perfluorocarbonabkömmlinge, die bei Zimmertemperatur zu lagern sind und weniger lang gespeichert werden, sind bekannt und entsprechende Emulsionen sind in der Entwicklung. Hier wird FMOQ (F-4-Methyl-okta-hydro-quinolidin) favorisiert (YOKOYAMA und Mitarbeiter 1983).

Einzelheiten über Anwendungsgebiete und Bereiche, auf denen bereits mit Fluorocarbonen wissenschaftliche Untersuchungen angestellt wurden, finden sich in der Arbeit von PFANNKUCH (1983).

II. Ausgangspunkt der Untersuchungen

Bereits in den ersten morphologishen Untersuchungen nach Anwendung von Fluorocarbonen (MASUDA und HORI 1973) wurde erkannt, daß die Emulsionströpfchen der Fluorocarbonemulsion offenbar vom retikuloendothelialen System als unspezifischer Fremdkörper erkannt und von der unspezifischen Abwehr aus dem Gefäßsystem eliminiert werden. Die Anhäufungen der injizierten Substanz in den Organen des retikuloendothelialen Systems folgt daraus. Umfassende Untersuchungen über die Ablagerung der Fluorocarbone nach parenteraler Anwendung wurden von der Arbeitsgruppe um PFANNKUCH und SCHNOY bzw. SCHNEIDER und HAUK im deutschsprachigen Raum vorgelegt (SCHNOY und PFANNKUCH 1980, PFANNKUCH und Mitarb. 1977, PFANNKUCH und SCHNOY 1979, PFANNKUCH und Mitarb. 1982, PFANNKUCH und SCHNOY 1982, PFANNKUCH und SCHNOY 1983, HOFFAHRT 1982, HARTMANN 1982, SCHNEIDER und Mitarb. 1977, 1978). In den Arbeiten konnte dargelegt werden, daß nach Anwendung der Substanzen parenteral (in Tierversuchen an Ratten) mit der Entfernung der Substanz aus dem Gefäßsystem eine Anhäufung in den Organen des retikuloendothelialen Systems (Leber, Milz, Lymphknoten, Nebennierenrinde, Knochenmark) auftritt, die in der Folge von Tagen und Monaten wieder abnimmt. Dies entspricht in anderen Untersuchungen gaschromatographisch festgestellten Ausscheidungsraten. Bei der Anwendung der für den Menschen vorgesehenen Dosis von 4 g/kg KG PFC-Substanzen waren an den untersuchten Organen anderweitige Veränderungen, wie entzündliche Reaktion oder Tumorentstehung niemals beobachtet worden. Bei der Erhöhung der Individualdosis wurden von ÖHLSCHLEGEL und Mitarb. (1982) granulomartige Veränderungen in der Leber und Milz beobachtet, die als Folge einer erhöhten geweblichen Reaktion auf vermehrten Zellzerfall gedeutet wurden. In früheren histologischen Untersuchungen (MASUDA u. HORI 1973; PFANNKUCH u. SCHNOY 1979) wurde vermutet, daß in der Leber und der Milz in Folge der Fluorocarbonanwendung eine Vermehrung von Bindegewebszellen und Bindegewebsfasern erkennbar ist.

Bindegewebe läßt sich durch vielfältige Stimulation wie z.B. Traumen, Druck, Strahlen, chronisches Ödem etc. zur Proliferation reizen. Es mußte also geprüft werden, ob die Speicherung von Fluorocarbonen oder ihre Ausscheidung einen solchen Reiz für eine Fibrose darstellt. Fibro-

se wird als Vermehrung von kollagenen Fasern in der Volumen- und Gewichtseinheit eines Gewebes definiert (SANDRITTER 1978). Die empfindlichste Bestimmung ist mit chemischen Methoden möglich.

Mit morphologischen Untersuchungen ließen sich in den Organen des retikulohistiozytären Systems chronisch entzündliche Veränderungen oder eine Fibrose nicht nachweisen; auch mittels Spezialfärbungen konnte eine Bindegewebsvermehrung nicht erkannt werden.
Eine grundlegende Arbeit zur Frage chronischer Schädigungen von Organen nach Anwendung der Fluorocarbone parenteral liegt von HARTMANN (1982) vor. Mittels der Hydroxyprolinmethode wurden aus Organhomogenisaten der Leber und der Milz die jeweiligen Werte des Bindegewebsgehaltes nach parenteraler Anwendung von Fluosol-DA 20% in verschieden hohen Dosierungen ermittelt. Zu Kontrollzwecken wurde auch der Bindegewebsgehalt der Lunge bestimmt, obwohl dieses Organ kein typisches Speicherorgan nach Fluorocarbonanwendung ist. In diesen Untersuchungen fand HARTMANN, daß bei der Anwendung von 3 ml Fluosol-DA 20% bei Ratten (entspricht etwa 4 g/kg KG) eine Erhöhung des Kollagenanteils in den Organen Milz und Leber nicht festzustellen war. Bei wiederholter Injektion von Fluosol-DA 20% bis hin zu 20 g PFC-Substanzen/kg KG wurde in der Leber nach 6 Monaten zwar ein Hydroxyprolingehalt ermittelt, der außerhalb des Normalbereiches lag, bei später durchgeführten Kontrolluntersuchungen (nach 12 Monaten) waren die Werte jedoch wieder im Normalbereich gefunden worden. Repräsentative Werte bezüglich der Milz konnten nicht ermittelt werden, da nach wiederholter Injektion von Fluosol-DA 20% eine Gewichtssteigerung in Extremfällen bis auf das Zehnfache des ursprünglichen Wertes auftrat. Die Gewichtssteigerung resultierte aus einer massiven Anhäufung von fluosolspeichernden Makrophagen und damit von nicht organeigenem Gewebe, was den gemessenen Bindegewebsgehalt erheblich verfälschen muß.

III. Ziel und Hypothesen der Untersuchungen

Ausgehend von den Ergebnissen der Arbeit von HARTMANN sollten statistisch einwandfreie Untersuchungen durchgeführt werden, d.h.

1. der Versuchsplan mußte nach statistischen Gesichtspunkten erstellt werden,
2. die Auswertung der Ergebnisse hatte unter statistisch relevanten Kriterien zu erfolgen,
3. Hinreichend große Tierzahlen waren zu untersuchen,
4. zu Kontrollzwecken sollte bei der Bindegewebsbestimmung ein standardisiertes, automatisches Verfahren zur Hydroxyprolinbestimmung angewendet werden,
5. parallel zu den Untersuchungen sollten ausgewählte Transaminasen bestimmt werden, um einen Leberzellschaden direkt darzustellen,
6. in histologischen Untersuchungen von Leber und Milz sollten die biochemisch gewonnenen Werte mit dem morphologischen Befund korreliert werden.

Die aus früheren Untersuchungen abzuleitenden Hypothesen sind demnach:

1. Nach Anwendung von Fluosol-DA 20% finden sich in den Hauptspeicherorganen Leber und Milz keine sicheren Hinweise für eine Bindegewebsvermehrung, sofern die Anwendung auf die sog. "Normdosis" von 4 g/kg KG beschränkt bleibt.
2. Bei Anwendung höherer Dosierung ist mit einer chronischen Organschädigung durch Fibrose (Bindegewebsvermehrung) zu rechnen.

B. Material und Methode

I. Substanz und Versuchstiere

Zur parenteralen Anwendung gelangte das Fluosol-DA 20% (Charge Nr. 037 GD dat. 5.1.1982, Februar 1982). Die tiefgefrorene Emulsion wurde in der Originalverpackung (Medidex-Beutel) aufgetaut, die zum jeweiligen Versuch nötige Menge entnommen und in einer sterilen Infusionsflasche mit den Adnexlösungen (C und H) gemischt.
Die fertige Emulsion wurde auf 39°C erwärmt. Die Versuchsttiere (männliche Ratten vom Wistar-Stamm) wurden unter identischen Bedingungen gehalten (Raum, Käfige, Temperatur, Futter, Wasser, Licht). Die Tiere

wurden über den Gesamtversuchszeitraum vom gleichen Tierpflegepersonal betreut. Das Durchschnittsgewicht der Tiere betrug bei Versuchsbeginn 203,4 g (Varianz 331,1, Standardabweichung 18,7, Variationskoeffizient 9,2%, Spannweite 162 - 239 g).
Die Injektion der Emulsion erfolgte intrakardial immer durch denselben Experimentator.

II. Statistische Methodik

Zur Anwendung gelangten:

1. Methoden der deskriptiven Statistik mit Ermittlung
   a) der Häufigkeitsverteilung,
   b) des Mittelwertes,
   c) des Medians,
   d) der Varianz,
   e) der Standardabweichung,
   f) des Variationskoeffizienten und
   g) der Spannweite.

2. Der Mann-Whitney-Test für unverbundene Stichproben. Hierbei wurde zweiseitig getestet mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 2 alpha = 0,05 (entspricht 5%).

Um die Genauigkeit der Hydroxyprolinmethode zu testen, wurden in Bezug auf die Extinctionsmessungen von allen Präzisionskontrollen ebenfalls o.g. Parameter der deskriptiven Statistik ermittelt (vgl. Tab. 3).

Tab. 3
Deskriptive Statistik der Präzisionskontrollen der Hydroxyprolinmessung

Kontr. Nr.	Extinction (nm)	Kontr. Nr.	Extinction (nm)	Kontr. Nr.	Extinction (nm)
1	1.35	11	1.5	21	1.55
2	1.4	12	1.5	22	1.5
3	1.4	13	1.55	23	1.5
4	1.5	14	1.55	24	1.5
5	1.5	15	1.55	25	1.55
6	1.45	16	1.5	26	1.55
7	1.5	17	1.55	27	1.5
8	1.5	18	1.45	28	1.55
9	1.45	19	1.55	29	1.55
10	1.45	20	1.5		

Mittelwert	1.4931
Median	1.5
Varianz	0.0029
Standardabweichung	0.055
Variationskoeffizient	3.68385%
Spannweite	1.35 - 1.55

Um eine zufällige Verteilung der Tiere auf die einzelnen Käfige und die einzelnen Gruppen zu gewährleisten, wurden alle Käfige durchnumeriert und die Tiere zufällig den einzelnen Käfigen zugeteilt. Die Einteilung der Käfige zu den Versuchsgruppen wurde anhand von Zufallszahlen vorgenommen (vgl. Tab. 4a).

Tab. 4a
Zufallszahlen

Käfignummern	Gruppeneinteilung nach Zufallzahlen	getötet nach
1	Kontrolle	9 Monaten
2	Kontrolle	6 Monaten
3	FDA	3 Monaten
4	FDA	6 Monaten
5	Doppelte Dosis	9 Monaten
6	FDA	9 Monaten
7	FDA	3 Tagen
8	Kontrolle	3 Tagen
9	Kontrolle	3 Monaten
10	Leergruppe	9 Monaten
11	3-fache Dosis	3 Monaten

Damit für die einzelnen Versuchs- und Kontrollgruppen Beobachtungs- und Strukturgleichheit erreicht wurden, wurde folgendermaßen verfahren:

a) Beobachtungsgleichheit:
   - Alle Tiere wurden von derselben Person narkotisiert.
   - Allen Tieren wurden von derselben Person entweder Fluosol-DA 20% oder NaCl 0,9% injeziert.
   - Die Hydroxyprolinwerte wurden von allen Tieren aus gefriergetrockneten Organen bestimmt.
   - Alle Messungen wurden zum gleichen Zeitpunkt nach Versuchsende von derselben Person durchgeführt.
   - Alle Messungen wurden zweimal vorgenommen und der Mittelwert zur weiteren Rechnung verwendet.
   - Fluosol-Gruppe und Kontrollgruppe wurden gleichzeitig behandelt.

b) Strukturgleichheit wurde dadurch erreicht, daß alle Tiere allen möglichen Einflußfaktoren (außer Fluosolanwendung) in gleichem Maße ausgesetzt waren. (Zufallsverteilung der Ratten zu den einzelnen Gruppen.)

c) Versuchsgruppen
   Es wurden 11 Gruppen zu je 10 Tieren gebildet. Alle Tiere wurden durchnumeriert (Tier Nr. 1 - 110). Aus Tab. 4b sind die Zuordnung der Tiere, das Versuchsverfahren und die Versuchsdauer ersichtlich.

Tab. 4b

Gruppe	Tier Nr.	Verfahren	Versuchsdauer
Gruppe 1	1 - 10	20 ml/kg F-DA 20 %	3 Tage
Gruppe 2	11 - 20	20 ml/kg NaCl 0.9%	3 Tage
Gruppe 3	21 - 30	20 ml/kg F-DA 20 %	3 Monate
Gruppe 4	31 - 40	20 ml/kg NaCl 0.9%	3 Monate
Gruppe 5	41 - 50	20 ml/kg F-DA 20 %	6 Monate
Gruppe 6	51 - 60	20 ml/kg NaCl 0.9%	6 Monate
Gruppe 7	61 - 70	20 ml/kg F-DA 20 %	9 Monate
Gruppe 8	71 - 80	20 ml/kg NaCl 0.9%	9 Monate
Gruppe 9	81 - 90	40 ml/kg F-DA 20 %	9 Monate
Gruppe 10	91 - 100	Kontrollgruppe	9 Monate
Gruppe 11	101 - 110	60 ml/kg F-DA 20 %	3 Monate

III: Versuchsablauf

Alle Tiere wurden mit Narkoseäther im getränkten Wattebausch unter der Glasglocke narkotisiert.
Fluosol-DA 20% und NaCl 0,9% wurde intrakardial injeziert.
Alle Tiere wurden mittels überdosierter CO_2-Narkose getötet.

IV. Hydroxyprolinmethode

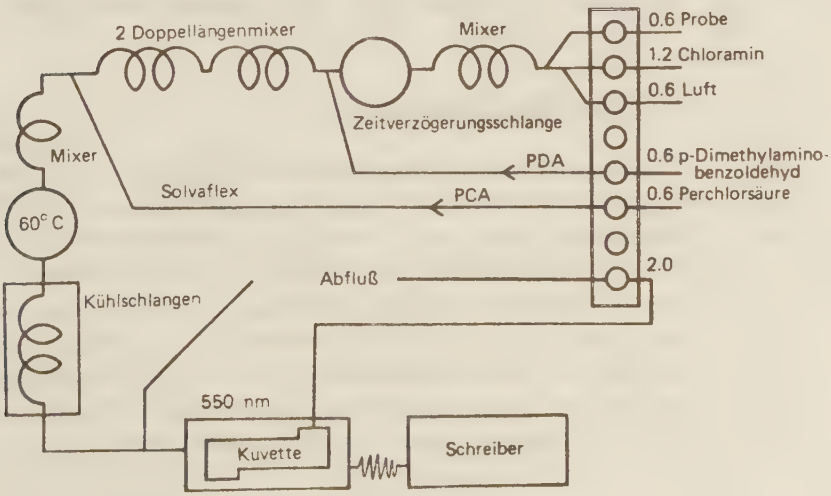
Die Hydroxyprolinkonzentration eines Gewebes ist proportional zum Kollagengehalt (NEUMANN und LOGAN 1950). Die von den Autoren entwickelte Methode, die auf der Pyrrolreaktion mit p-Dimethylaminobenzaldehyd nach Umwandlung des Hydroxyprolins in Pyrrol beruht, wurde von STEGEMANN weiterentwickelt (STEGEMANN 1958). GRANT (1964) modifizierte die Methode für die Anwendung am Autoanalyzer.

Die zu untersuchenden Organe (Leber und Milz) wurden mittels Homogenisator (Ultraturrax) in einem Glaskolben unter Zugabe von Aqua

dest. 2 - 3 Minuten homogenisiert.

Das Homogenisat wurde bis zur Gewichtskonstanz bei 10^{-3} Torr und minus 80°C gefriergetrocknet. Der Restwassergehalt lag bei 22 Messungen zwischen 7,5% und 8% und wurde im weiteren als konstant angenommen. Mit einem Mörser wurde das Gewebe in Pulverform gebracht.

Autoanalyzer Methode:
Die Untersuchungen wurden freundlicherweise im Department für Klinische Chemie der Universität Ulm (geschäftsführender Direktor: Priv.-Doz. Dr. V. Meier) durchgeführt.
Der Nachweis des Hydroxyprolins beruht auf der Oxidation der Substanz mit Chloramin-T und anschließender Reaktion des dabei entstehende Pyrrols mit p-Dimethylaminobenzaldehyd. Überschüssiges Chloramin-T wird durch Perchlorsäure zerstört. Die Extinktion wird bei 550 nm gemessen. Das hydrolisierte Gewebe wurde mit einem Gemisch aus Norit-A und Amberlite vorbehandelt. Mit diesen von PROCKOP und UDENFRIEND (1960) beschriebenen Verfahren wurden eventuell reaktionsstörende Chromogene entfernt (vgl. auch KIVIRIKKO und Mitarb. 1967, PROCKOP und KIVIRIKKO 1967). Die verwendeten Reagenzien und Lösungen sind bei BURKHARDT und Mitarbeiter (1974) beschrieben.
Das verwendete Fließdiagramm ist in Abb. 3 dargestellt.



Der Hydroxyprolingehalt errechnete sich wie folgt:

$$\frac{\text{Extinktion der Probe x Volumen der Probe}}{\text{Einwaage Trockengewicht}} = \text{Hyroxyprolin } (\mu g/ml)$$

Der prozentuale Anteil an Kollagen wird durch Multiplikation der Hydroxyprolinwerte mit dem Faktor 7,46 errechnet (NEUMANN und LOGAN 1950).

V. Blutserumuntersuchungen

Nach Versuchsende wurde bei allen Tieren 2 ml Blut durch kardiale Punktion entnommen und anschließend mit 0,1 ml Liquemin^{R} versetzt. Nach 2,5 Minuten Zentrifugation bei 10.000 Umdrehungen/Minute wurde das Serum abpipettiert und bei -80°C eingefroren. Bestimmt wurden die Glutamat-Oxalat-Transaminase (GOT) und die Alkalische Phosphatase (AP). Hierdurch sind Rückschlüsse auf eine diskrete Leberzellschädigung und / oder Gallengangsepithelschädigungen erfaßbar. Beide Bestimmungen erfolgten mit dem Autoanalyzer ACP 5040 (Eppendorf). Als Methode kam jeweils die "optimierte Standardmethode" der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie zur Anwendung. Die Untersuchungen wurden freundlicherweise im Klinisch-chemischen Zentrallabor des Universitätsklinikums Charlottenburg (Direktor: Prof. Dr. E. Köttgen) durchgeführt.

VI. Histologische Untersuchungen

Histologische Untersuchungen von Leber und Milz wurden durchgeführt. Die Fixierung erfolgte in neutralisiertem, 10%-igem Formaldehyd. Nach Entwässerung durch die aufsteigende Alkoholreihe (60,70,80 und 96% Äthanol) und Entfernung des Alkohols mit Xylol wurden die Organe in Paraffin eingebettet (ROMEIS § 380-535). Anschließend wurden am Schlittenmikrotom 4µm dicke Schnitte hergestellt. Die Färbung der Präparate erfolgte mit Hämalaun-Eosin (ROMEIS § 703). Die histologische Aufarbeitung erfolgte im Sektionslabor des Instituts für Pathologie (Direktor Prof. Dr.S.Blümcke) des Universitätsklinkums Charlottenburg.

C. Ergebnisse

1. Leber

Die Ergebnisse der

1. Bindegewebsbestimmung und

2. der Blutserumuntersuchungen

sind in den Tabellen 5 - 15 und in Abbildung 4 - 6 niedergelegt.

Tabelle 5
Meßwerte für Gruppe 1 (20ml/kg KG Fluosol-DA 20%, Versuchsdauer 3 Tage)

Tier Nr.	Ext.	HP (µg/mg)	% K	Gewicht Leber(g)	Gesamt-gewicht(g)	GOT (U/l)	AP (U/l)
1	1.05	0.38	2.835	9.53	220.6	36	67
2	0.9	0.34	2.536	8.01	201.6	51	68
3	1.05	0.38	2.835	7.0	162.4	54	85
4	1.0	0.38	2.835	8.46	220.8	51	57
5	1.1	0.41	3.059	7.98	193.8	57	65
6	0.95	0.38	2.835	8.76	171.4	39	70
7	0.9	0.34	2.536	8.45	208.1	51	73
8	1.15	0.42	3.133	7.63	214.8	66	197
9	0.85	0.33	2.462	9.30	207.7	42	215
10	1.1	0.41	3.059	8.26	186.2	45	101
Mittelwert		0.38		8.338	198.74	45.2	99.8
Standardabw.		0.03				8.97	57.42
Median		0.38				51.0	71.5
Varianz		0.0009				72.36	2967.56
Spannweite		0.33-0.42				36-66	57-215
Variat.-koeff.		7.89%				19.84%	57.54%

Tabelle 6
Meßwerte für Gruppe 2 (20 ml/kg KG NaCl 0,9%, Versuchsdauer 3 Tage)

Tier Nr.	Ext.	HP (µg/mg)	% K	Gewicht Leber(g)	Gesamt-gewicht(g)	GOT (U/l)	AP (U/l)
11	1.2	0.45	3.357	7.9	241.0	39	169
12	1.0	0.38	2.835	8.0	204.0	60	230
13	1.2	0.45	3.357	8.74	218.6	36	266
14	1.3	0.49	3.655	7.24	211.5	45	179
15	1.25	0.47	3.506	7.61	225.2	36	196
16	1.05	0.39	2.909	8.31	203.3	45	79
17	1.25	0.47	3.506	6.88	194.6	51	258
18	1.0	0.38	2.835	6.62	181.9	42	37
19	1.0	0.38	2.835	6.88	218.7	39	68
20	1.1	0.41	3.059	6.89	202.6	57	77
Mittelwert		0.43		7.507	210.14	45.0	154.9
Standardabw.		0.043				8.49	84.56
Median		0.43				43.5	174.0
Varianz		0.002				64.8	6435.29
Spannweite		0.38-0.49				36-60	37-258
Variat.-koeff.		10.0%				18.86%	54.59%

Tabelle 7
Meßwerte für Gruppe 3 (20ml/kg KG Fluosol-DA 20%, Versuchsdauer 3 Monate)

Tier Nr.	Ext.	HP (µg/mg)	% K	Gewicht Leber(g)	Gesamt-gewicht(g)	GOT (U/l)	AP (U/l)
21	0.7	0.26	1.94	17.2	343.2	36	45
22	1.35	0.51	3.805	8.69	243.8	39	75
23	1.5	0.56	4.178	7.63	234.0	42	58
24	1.05	0.39	2.909	11.54	257.7	45	59
25	0.85	0.32	2.387	8.41	229.6	54	119
26	1.05	0.39	2.909	9.2	261.2	39	39
27	0.95	0.36	2.868	10.38	218.2	x)	x)
28	1.1	0.41	3.059	10.08	310.5	48	64
29	1.05	0.39	2.909	11.25	302.2	x)	x)
30	1.5	0.56	4.178	8.56	217.9	x)	x)
Mittelwert		0.41		10.314	261.83	43.29	65.57
Standardabw.		0.099				6.21	26.38
Median		0.39				42.0	59.0
Varianz		0.008				33.06	396.53
Spannweite		0.26-0.56				36-54	39-119
Variat.-koeff.		24.0%				14.35%	40.23%

Tabelle 8
Meßwerte für Gruppe 4 (20ml/kg KG NaCl 0,9%, Versuchsdauer 3 Monate)

Tier Nr.	Ext.	HP (µg/mg)	% K	Gewicht Leber(g)	Gesamt-gewicht(g)	GOT (U/l)	AP (U/l)
31	0.75	0.28	2.089	14.25	394.1	51.9	143
32	1.05	0.39	2.909	13.23	378.9	54	148
33	0.9	0.34	2.536	17.03	413.5	x)	x)
34	0.9	0.34	2.536	8.72	231.0	48	49
35	1.1	0.41	3.059	8.69	232.7	x)	x)
36	1.45	0.54	4.028	9.90	234.4	42	33
37	1.05	0.39	2.909	10.20	243.5	39	42
38	1.2	0.45	3.357	6.46	203.3	54	40
39	1.15	0.43	3.208	7.02	216.9	x)	x)
40	0.95	0.36	2.686	7.44	233.8	x)	x)
Mittelwert		0.39		10.321	278.21	48.0	75.839
Standardabw.		0.071				6.29	54.22
Median		0.39				49.5	45.5
Varianz		0.0046				33.0	2450.47
Spannweite		0.28-0.54				39-54	33-148
Variat.-koeff.		18.2%				13.11%	71.51%

Tabelle 9
Meßwerte für Gruppe 5 (20ml/kg KG Fluosol-DA 20%, Versuchsdauer 6 Monate)

Tier Nr.	Ext.	HP (µg/mg)	% K	Gewicht Leber(g)	Gesamt-gewicht(g)	GOT (U/l)	AP (U/l)
41	0.8	0.30	2.686	15.1	474.3	51	99
42	0.7	0.26	1.94	19.4	486.9	50	101
43	1.05	0.39	2.91	16.9	416.5	x)	x)
44	0.95	0.36	2.69	14.64	452.3	x)	x)
45	1.1	0.41	3.059	14.4	435.3	42	112
46	1.0	0.38	2.835	14.2	436.3	45	138
47	1.0	0.38	2.835	11.6	415.8	48	121
48	1.15	0.43	3.208	12.58	429.0	42	243
49	0.8	0.30	2.686	13.17	473.6	x)	x)
50	0.95	0.36	2.286	12.49	418.0	36	154
Mittelwert		0.36		14.5	443.8	44.86	138.33
Standardabw.		0.054				5.39	50.22
Median		0.37				45.0	116.5
Varianz		0.0026				24.12	2162.2
Spannweite		0.26-0.43				36-51	99-234
Variat.-koeff.		15%				11.82%	36.3%

Tabelle 10
Meßwerte für Gruppe 6 (20ml/kg KG NaCl 0,9%, Versuchsdauer 6 Monate)

Tier Nr.	Ext.	HP (µg/mg)	% K	Gewicht Leber(g)	Gesamt-gewicht(g)	GOT (U/l)	AP (U/l)
51	1.05	0.39	2.916	13.95	507.0	45	87
52	0.75	0.28	2.089	15.39	494.2	30	85
53	0.95	0.36	2.686	14.6	488.2	57	138
54	0.95	0.36	2.686	13.2	400.0	42	187
55	0.9	0.34	2.536	13.12	394.7	36	169
56	1.0	0.38	2.835	10.64	402.9	36	132
57	0.85	0.32	2.387	13.56	462.5	x)	x)
58	1.25	0.47	3.506	11.02	401.2	48	203
59	1.2	1.45	3.357	10.71	417.2	42	91
60	1.05	0.39	2.91	11.33	417.3	33	112
Mittelwert		0.37		12.75	438.5	41.0	119.89
Standardabw.		0.057				8.35	44.38
Median		0.37				42.0	132.0
Varianz		0.0028				62.0	1750.84
Spannweite		0.28-0.47				30-57	85-203
Variat.-koeff.		15.4%				20.36%	37.01%

Tabelle 11
Meßwerte für Gruppe 7 (20ml/kg KG Fluosol-DA 20%, Versuchsdauer 9 Monate)

Tier Nr.	Ext.	HP (µg/mg)	% K	Gewicht Leber(g)	Gesamt-gewicht(g)	GOT (U/l)	AP (U/l)
61	1.25	0.47	3.506	13.00	391.2	63	53
62	0.8	0.3	2.238	17.52	600.8	48	153
63	1.05	0.39	2.909	16.03	534.0	36	81
64	1.05	0.39	2.904	16.16	550.6	27	40
65	1.35	0.51	3.805	17.97	427.2	x)	x)
66	1.05	0.39	2.909	13.77	427.2	36	96
67	1.0	0.38	2.835	17.36	551.8	39	109
68	0.9	0.34	2.536	16.03	535.2	39	127
69	0.8	0.3	2.238	15.92	602.1	54	196
70	0.92	0.34	2.536	14.6	390.0	45	171
Mittelwert		0.38		15.53	501.28	43.0	114.0
Standardabw.		0.068				10.81	52.79
Median		0.38				39.0	109.0
Varianz		0.0041				104.0	2477.56
Spannweite		0.3-0.51				27-63	53-196
Variat.-koeff.		17.89%				25.16%	40.31%

Tabelle 12
Meßwerte für Gruppe 8 (20ml/kg KG NaCl 0,9%, Versuchsdauer 9 Monate)

Tier Nr.	Ext.	HP (µg/mg)	% K	Gewicht Leber(g)	Gesamt-gewicht(g)	GOT (U/l)	AP (U/l)
71	1.00	0.38	2.835	15.78	421.2	39	76
72	1.1	0.41	3.059	14.67	443.5	57	131
73	1.1	0.41	3.059	14.46	478.0	30	112
74	0.95	0.36	2.686	14.2	406.6	x)	x)
75	1.0	0.38	2.835	14.28	473.4	45	87
76	0.85	0.32	2.387	15.69	498.5	42	142
77	1.0	0.34	2.536	14.9	513.7	36	95
78	0.8	0.30	2.238	14.3	417.2	42	225
79	0.85	0.32	2.835	17.68	497.2	x)	x)
80	0.1	0.26	1.94	15.1	501.5	45	170
Mittelwert		0.35		15.1	465.08	42.0	129.75
Standardabw.		0.049				7.86	49.49
Median		0.35				42.0	121.5
Varianz		0.0022				54.0	2135.44
Spannweite		0.26-0.41				30-57	76-225
Variat.-koeff.		14%				18.7%	38.07%

Tabelle 13
Meßwerte für Gruppe 9 (40ml/kg KG Fluosol-DA 20%, Versuchsdauer 9 Monate)

Tier Nr.	Ext.	HP (µg/mg)	% K	Gewicht Leber(g)	Gesamt-gewicht(g)	GOT (U/l)	AP (U/l)
81	1.1	0.41	3.059	9.54	243.7	30	77
82	1.35	0.51	3.805	10.76	295.9	x)	x)
83	1.1	0.41	3.059	10.24	290.1	x)	x)
84	1.15	0.43	3.208	12.13	330.6	74	30
85	1.0	0.38	2.835	8.73	226.1	36	44
86	1.3	0.49	3.655	8.89	242.6	64	48
87	1.2	0.45	3.357	11.53	314.1	73	54
88	1.35	0.51	3.805	9.2	243.0	x)	x)
89	1.3	0.49	3.655	9.04	275.3	44	71
90	1.3	0.49	3.655	8.55	270.9	50	62
Mittelwert		0.46		9.86	273.23	53.0	55.14
Standardabw.		0.047				17.65	16.25
Median		0.47				50.0	54.0
Varianz		0.0020				267.14	226.4
Spannweite		0.38-0.51				30-74	30-77
Variat.-koeff.		10.21%				33.3%	29.47%

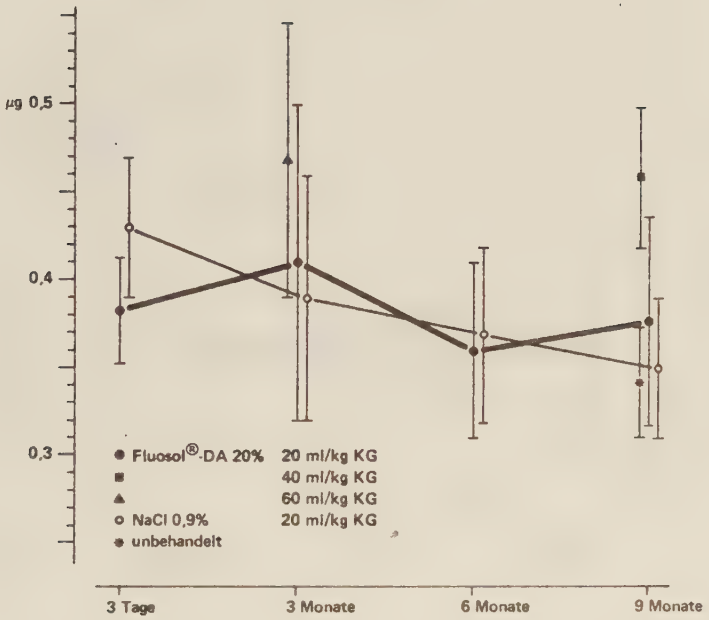
Tabelle 14
Meßwerte für Gruppe 10 (nicht behandelt, Versuchsdauer 9 Monate)

Tier Nr.	Ext.	HP (µg/mg)	% K	Gewicht Leber(g)	Gesamt-gewicht(g)	GOT (U/l)	AP (U/l)
91	0.8	0.34	2.238	14.8	453.03	42	122
92	0.95	0.36	2.686	15.9	454.03	39	118
93	0.8	0.3	2.238	13.9	456.3	35	107
94	0.95	0.36	2.686	15.3	433.7	x)	x)
95	1.0	0.38	2.835	14.4	459.8	34	111
96	0.95	0.36	2.686	13.1	446.3	44	103
97	1.0	0.38	2.835	15.6	488.0	63	97
98	0.8	0.3	2.238	16.5	451.9	x)	x)
99	0.8	0.3	2.238	16.5	460.0	43	108
100	0.85	0.32	2.387	14.2	442.3	47	95
Mittelwert		0.34		14.93	453.53	43.38	106.38
Standardabw.		0.035				9.08	9.41
Median		0.34				42.5	107.5
Varianz		0.0011				72.23	77.48
Spannweite		0.3-0.38				34-63	95-118
Variat.-koeff.		10.24%				20.94%	8.84%

Tabelle 15
Meßwerte für Gruppe 11 (60ml/kg KG Fluosol-DA 20%,Versuchdauer 3 Monate)

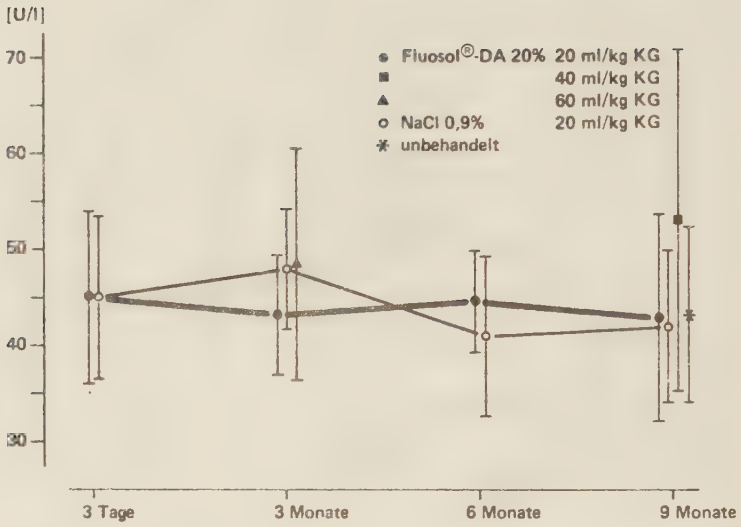
Tier Nr.	Ext.	HP (µg/mg)	% K	Gewicht Leber(g)	Gesamt-gewicht(g)	GOT (U/l)	AP (U/l)
101	1.65	0.62	4.625	8.78	302.2	45	68
102	1.5	0.56	4.178	11.8	295.5	48	64
103	1.05	0.39	2.909	10.6	277.3	45	54
104	1.1	0.41	3.059	9.3	247.2	57	84
105	1.3	0.49	3.655	11.2	296.9	54	57
106	1.15	0.43	3.208	10.6	294.2	42	79
107	1.1	0.41	3.059	10.48	281.4	x)	x)
108	1.0	0.38	2.835	9.6	279.2	x)	x)
109	1.55	0.58	4.326	9.4	270.3	x)	x)
110	1.1	0.41	3.059	9.9	283.4	x)	x)
Mittelwert		0.47		9.91	282.8	48.5	67.67
Standardabw.		0.088				5.82	11.91
Median		0.42				46.5	66.0
Varianz		0.007				28.25	118.22
Spannweite		0.38-0.62				42-57	54-79
Variat.-koeff.		18.72%				12.0%	17.6%

Abb. 4



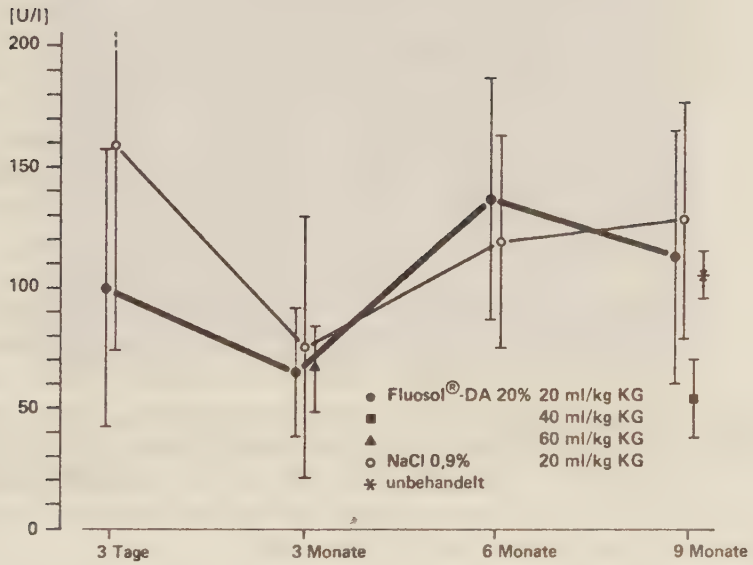
Hydroxyprolinwerte der Leber und Standarabweichungen von 110 Wistarratten über einen Beobachtungszeitraum von 3 Tagen bis 9 Monaten.

Abb. 5



Glutamat-Oxalat-Transaminase (GOT) und Standardabweichungen von 110 Wistarratten über einen Beobachtungszeitraum von 3 Tagen bis 9 Monaten

Abb. 6



Alkalische Phosphatase (AP) und Standardabweichungen von 110 Wistarratten über einen Beobachtungszeitraum von 3 Tagen bis 9 Monaten

3. Histologische Untersuchungen

Das histologische Bild der Leber 3 Tage (Abb. 7), 3 Monate (Abb. 8), 6 Monate (Abb. 9) und 9 Monate (Abb. 10) nach parenteraler Anwendung von 20 ml Fluosol-DA 20% zeigt Makrophagen mit einer Konzentrierung der speichernden Zellen im oder um das periportale Feld herum. Im Verlauf der Monate nach Applikation nimmt die Zahl der speichernden Zellen ständig ab, und nach 9 Monaten sind nur noch einzelne speichernde Zellen zu finden.

Anmerkung: Wie bereits in früheren Arbeiten dargelegt, sieht man nur Aequivalente der Speicherung, d. h. Vakuolen, da die Substanz selbst im Rahmen der histologischen Aufarbeitung herausgelöst wird; da vakuoläre Bildungen im histologischen Bild oft aufzufinden sind (z. B. Fettgewebe) ist die Differenzierung oder Identifizierung von Fluorocarbon nicht immer mit letzter Sicherheit möglich; die Fluorocarbonvakuolen haben jedoch eine charakterisierende, elektronenmikroskopisch dargelegte Morphologie (SCHNOY und PFANNKUCH 1980).

In Abb. 11 u. 12 werden die Ablagerungen der PFC-Substanzen nach 3 Monaten bei verschieden hoher Dosierung verglichen (Abb. 11, 20 ml PFC/kg KG; Abb. 12, 60 ml/kg KG). Die Ablagerung in dem Organ ist nach Anwendung einer dreifachen Substanzmenge naturgemäß wesentlich höher als nach Applikation der "Normdosis". Bei der Anwendung von 40 ml Fluosol-DA 20% wird auch nach 9 Monaten noch eine erhebliche Anzahl von Makrophagen im Periportalfeld vorgefunden (Abb. 13 u. 14). Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung ergeben sich keine Anhaltspunkte für eine chronische Entzündung oder für eine Bindegewebsvermehrung.

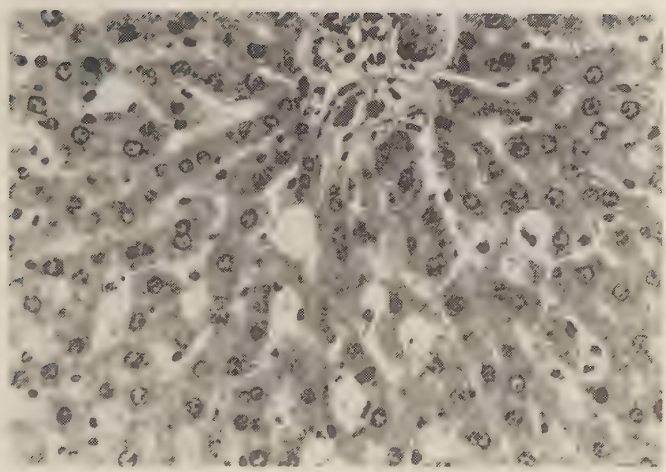


Abb. 7: Leber 3 Tage nach Applikation von 20 ml Fluosol-DA 20 %/kg Körpergewicht. Zahlreiche omnilobulär in den Sinusoiden verteilte, speichernde Makrophagen (inklusiv v. Kupffer'sche Sternzellen). (Paraffin, Hämalaun-Eosin, Vergr. 360x, Tier Nr. 3)

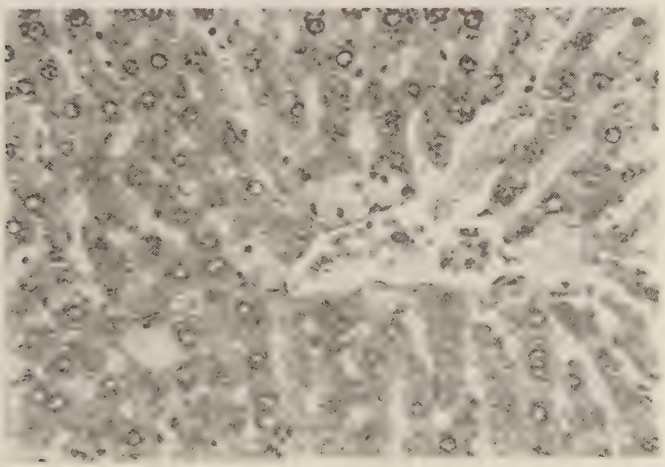


Abb. 8: Leber 3 Monate nach Applikation von 20 ml PFC/kg KG.Verminderung der Zahl der Makrophagen. Konzentration um die Zentralvenen (im Bild) und im Periportalfeld; feinvakuoläres Speicherungsmuster. (Paraffin, H-E, Vergr.360x, Tier Nr. 23)

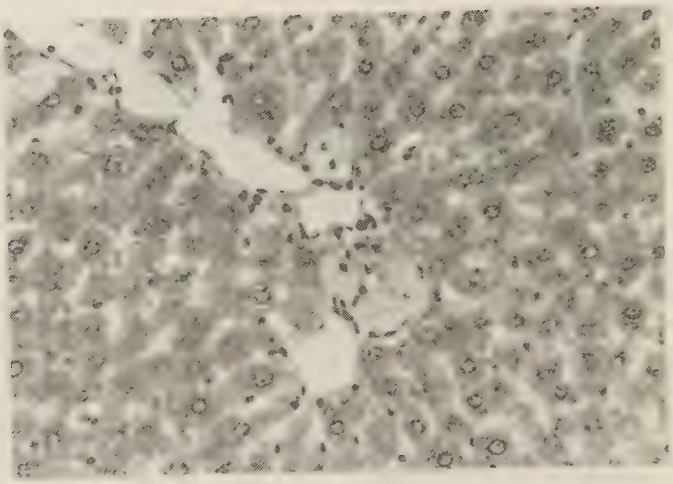


Abb.9: Leber 6 Monate nach Applikation von 20 ml PFC/ kg KG. Weitere Abnahme der Zahl speichernder Makrophagen und Konzentration im periportalen Feld. (Paraffin, H-E, Vergr. 360x, Tier Nr. 50)

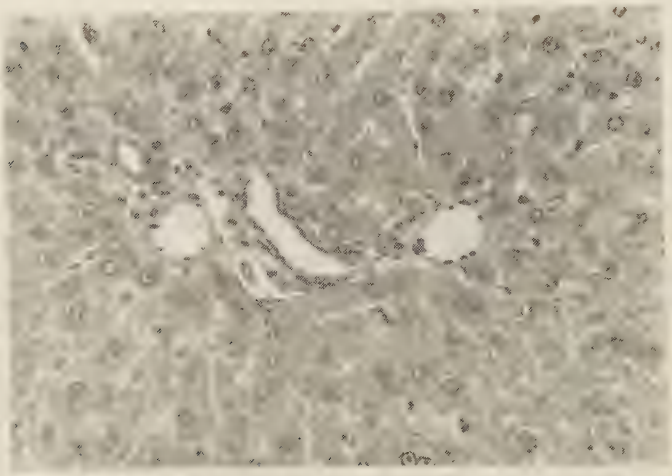


Abb.10: Leber 9 Monate nach Applikation von 20 ml PFC/ kg KG. Auch im periportalen Feld sind keine (kaum noch) Speicherzellen auffindbar. Die Leberstruktur ist erhalten. (Paraffin, H-E, Vergr. 360x, Tier Nr. 67)

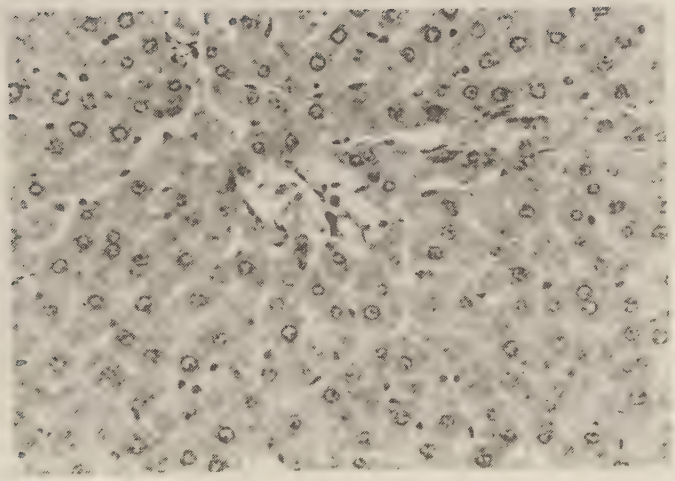


Abb.11: Leber 3 Monate nach Applikation von 20 ml PFC/ kg KG. Nur noch wenige periportal konzentrierte Speicherzellen (entspricht Abb. 8). (Paraffin, H-E, Vergr. 360x, Tier Nr. 23)

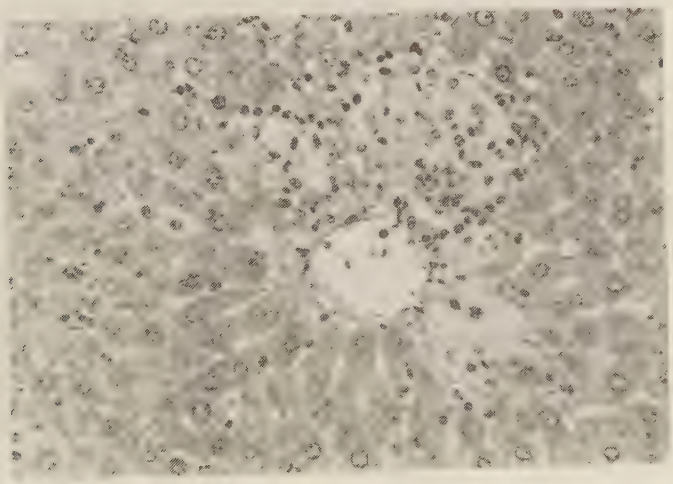


Abb.12: Leber 3 Monate nach Applikation von 60 ml PFC/ kg KG. Massive Substanzablagerung (hier in der Nähe der Zentralvene) mit Vermehrung von Lymphozyten und Plasmazellen. (Paraffin, H-E, Vergr. 360x, Tier Nr. 106)

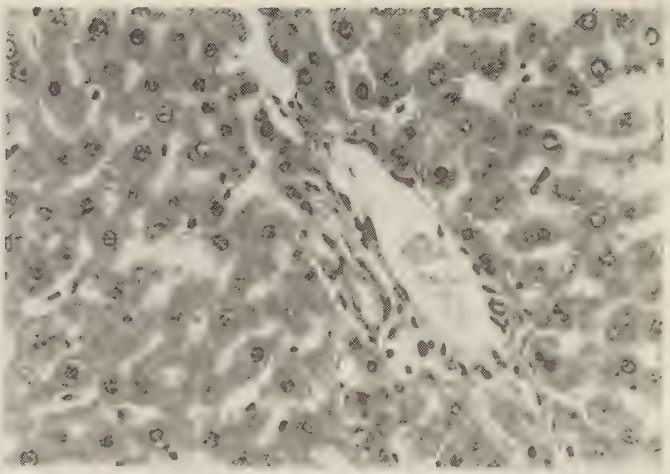


Abb. 13: Leber 9 Monate nach Applikation von 20 ml PFC/kgKG. Einzelne Speicherzellen im Periportalfeld. (Paraffin, H-E, Vergr. 360x, Tier Nr. 63)

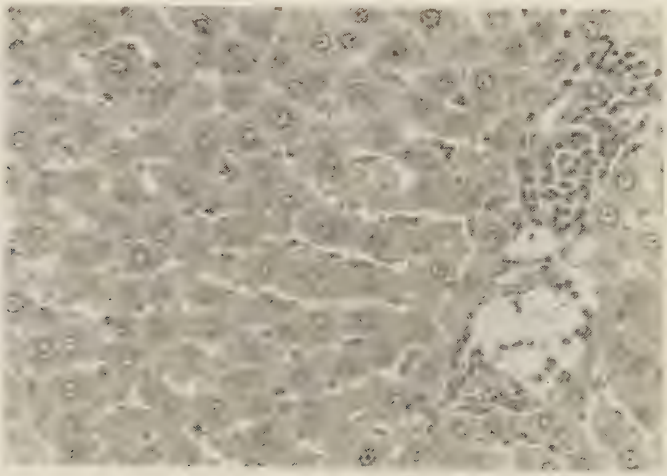


Abb. 14: Leber 9 Monate nach Applikation von 40 ml PFC/kg KG. Zahlreiche Makrophagen im Periportalfeld. (Paraffin, H-E, Vergr. 360x, Tier Nr. 87)

II. Milz

Die Werte für die

1. Hydroxyprolinbestimmung des Milzgewebes und
2. die Angabe des Milzgewichts sowie des Gesamtgewichts der Tiere sind in den Tabellen 16 - 26 und in Abbildung 15 dargelegt.

Tabelle 16
Meßwerte für Gruppe 1 (20ml/kg KG Fluosol-DA 20%, Versuchsdauer 3 Tage)

Tier Nr.	Ext.	HP (µg/mg)	% K	Gewicht Milz (g)	Gesamt-gewicht (g)
1	2.15	1.11	8.206	1.35	220.6
2	1.8	0.9	6.714	0.95	201.6
3	1.5	0.75	5.595	1.21	162.4
4	1.55	0.77	5.744	1.0	220.8
5	1.75	0.87	6.490	0.89	193.8
6	1.55	0.77	5.744	1.16	171.4
7	1.95	0.97	7.236	1.14	208.1
8	1.35	0.66	4.849	1.41	214.8
9	0.95	0.5	3.73	2.0	207.7
10	1.6	0.8	5.968	0.96	186.2
Mittelwert		0.81		1.207	198.74
Standardabw.		0.167			
Median		0.78			
Varianz		0.0249			
Spannweite		0.5-1.1			
Variat.-koeff.		20.6%			

Tabelle 17
Meßwerte für Gruppe 2 (20ml/kg KG NaCl 0,9% Versuchsdauer 3 Tage)

Tier Nr.	Ext.	HP (µg/mg)	% K	Gewicht Milz (g)	Gesamt-gewicht (g)
11	1.95	0.97	7.236	0.8	241.0
12	1.75	0.87	6.49	0.6	204.0
13	2.45	1.22	9.101	0.95	218.6
14	2.4	1.2	8.952	0.76	211.5
15	2.05	1.0	7.46	0.84	225.2
16	1.65	0.82	6.117	1.0	203.3
17	1.6	0.8	5.986	0.88	194.6
18	2.5	1.25	9.325	0.54	181.9
19	2.05	1.02	7.609	0.71	218.7
20	1.45	0.75	5.595	0.75	202.6
Mittelwert		0.99		0.75	210.4
Standardabw.		0.188			
Median		0.98			
Varianz		0.0318			
Spannweite		0.75-1.25			
Variat.-koeff.		18.98%			

Tabelle 18
Meßwerte für Gruppe 3 (20ml/kg KG Fluosol-DA 20%, Versuchsdauer 3 Monate)

Tier Nr.	Ext.	HP (µg/mg)	% K	Gewicht Milz (g)	Gesamt-gewicht (g)
21	3.20	1.60	11.936	0.85	343.2
22	2.8	1.4	10.444	0.66	243.8
23	2.1	1.09	8.134	0.78	234.0
24	2.3	1.15	8.579	1.10	257.7
25	2.3	1.15	8.579	0.8	229.6
26	2.9	1.45	10.817	0.78	261.2
27	2.55	1.27	9.474	0.81	218.2
28	3.15	1.57	11.712	0.78	310.5
29	2.95	1.47	10.966	1.17	302.9
30	2.4	1.2	8.952	1.0	217.9
Mittelwert		1.33		0.873	261.83
Standardabw.		0.192			
Median		1.33			
Varianz		0.0333			
Spannweite		1.09-1.6			
Variat.-koeff.		14.43%			

Tabelle 19
Meßwerte für Gruppe 4 (20ml/kg KG NaCl 0,9%, Versuchsdauer 3 Monate)

Tier Nr.	Ext.	HP (µg/mg)	% K	Gewicht Milz (g)	Gesamt-gewicht (g)
31	2.7	1.35	10.071	0.92	394.1
32	3.7	1.85	13.801	0.73	378.9
33	5.25	2.62	19.545	0.57	413.5
34	3.9	1.95	14.547	0.52	231.0
35	4.0	2.0	14.92	0.51	232.7
36	3.2	1.6	11.936	0.61	234.4
37	3.5	1.75	13.055	0.55	243.5
38	3.7	1.85	13.801	0.49	203.3
39	3.3	1.65	12.309	0.43	216.9
40	3.5	1.75	13.055	0.49	233.8
Mittelwert		1.84		0.582	278.21
Standardabw.		0.333			
Median		1.8			
Varianz		0.0966			
Spannweite		1.35-2.62			
Variat.-koeff.		18.09%			

Tabelle 20
Meßwerte für Gruppe 5 (20ml/kg KG Fluosol-DA 20%, Versuchsdauer 6 Monate)

Tier Nr.	Ext.	HP (µg/mg)	% K	Gewicht Milz (g)	Gesamt-gewicht (g)
41	3.65	1.82	13.577	0.7	474.3
42	4.0	2.0	14.92	0.65	486.9
43	4.35	2.17	16.188	0.82	416.5
44	3.05	1.52	11.339	1.25	452.3
45	3.85	1.92	14.323	0.98	435.3
46	3.85	1.92	14.323	0.92	436.3
47	3.55	1.77	13.204	0.86	415.8
48	3.4	1.7	12.682	0.83	429.0
49	2.95	1.47	10.966	0.75	473.6
50	3.5	1.75	13.055	1.0	418.0
Mittelwert		1.8		0.88	443.8
Standardabw.		0.212			
Median		1.76			
Varianz		0.0407			
Spannweite		0.82-2.17			
Variat.-koeff.		11.77%			

Tabelle 21
Meßwerte für Gruppe 6 (20ml/kg KG NaCl 0,9%, Versuchsdauer 6 Monate)

Tier Nr.	Ext.	HP (µg/mg)	% K	Gewicht Milz (g)	Gesamt-gewicht (g)
51	3.65	1.82	13.577	0.8	507.0
52	4.0	2.0	14.92	0.8	494.2
53	3.75	1.87	13.95	0.8	488.2
54	4.0	2.0	14.92	0.63	400.0
55	4.6	2.3	17.158	0.72	394.4
56	3.6	1.8	13.428	0.67	402.9
57	4.0	2.0	14.92	0.62	462.5
58	3.65	1.82	13.577	0.65	401.2
59	3.95	1.97	14.696	0.76	417.2
60	4.4	2.2	16.412	0.66	417.3
Mittelwert		1.98		0.71	438.5
Standardabw.		0.166			
Median		1.98			
Varianz		0.0248			
Spannweite		1.8-2.3			
Variat.-koeff.		8.38%			

Tabelle 22
Meßwerte für Gruppe 7 (20ml/kg KG Fluosol-DA 20%, Versuchsdauer 9 Monate)

Tier Nr.	Ext.	HP (µg/mg)	% K	Gewicht Milz (g)	Gesamt-gewicht (g)
61	3.2	1.6	11.936	0.95	391.2
62	3.0	1.5	11.19	1.13	600.8
63	3.4	1.7	12.682	0.87	534.0
64	3.35	1.67	12.458	0.8	550.6
65	3.6	1.8	13.428	0.84	427.2
66	3.2	1.6	11.936	0.82	427.2
67	3.8	1.9	14.174	0.82	551.8
68	4.0	2.0	14.92	0.82	535.2
69	2.95	1.47	10.966	1.13	602.1
70	3.7	1.85	13.801	0.9	390.0
Mittelwert		1.71		0.89	501.28
Standardabw.		0.175			
Median		1.68			
Varianz		0.0275			
Spannweite		1.47-2.0			
Variat.-koeff.		10.23%			

Tabelle 23
Meßwerte für Gruppe 8 (20ml/kg KG NaCl 0,9%, Versuchsdauer 9 Monate)

Tier Nr.	Ext.	HP (µg/mg)	% K	Gewicht Milz (g)	Gesamt-gewicht (g)
71	3.6	1.8	13.428	0.8	421.2
72	3.35	1.67	12.458	0.71	443.5
73	3.65	1.82	13.577	0.75	478.0
74	3.8	1.9	14.174	0.7	406.6
75	3.5	1.75	11.19	0.77	473.4
76	4.35	2.17	16.188	0.71	498.5
77	4.45	2.22	16.561	0.99	513.7
78	4.4	2.2	16.412	0.81	417.2
79	3.25	1.62	12.085	0.72	497.2
80	3.6	1.8	13.428	0.77	501.5
Mittelwert		1.89		0.77	465.08
Standardabw.		0.222			
Median		1.81			
Varianz		0.0445			
Spannweite		1.62-2.22			
Variat.-koeff.		11.74%			

Tabelle 24
Meßwerte für Gruppe 9 (40ml/kg KG Fluosol-DA 20%, Versuchsdauer 9 Monate)

Tier Nr.	Ext.	HP (µg/mg)	% K	Gewicht Milz (g)	Gesamt-gewicht (g)
81	3.65	1.82	13.577	0.95	243.7
82	2.8	1.4	10.444	0.82	295.9
83	3.15	1.97	11.712	0.9	290.1
84	2.25	1.12	8.355	1.3	330.6
85	3.4	1.7	12.682	0.9	226.1
86	3.15	1.57	11.712	0.72	242.6
87	2.85	1.42	10.593	1.09	314.1
88	4.0	2.0	14.92	0.9	243.0
89	4.25	2.42	7.46	0.88	275.3
90	4.0	2.0	14.92	0.78	270.9
Mittelwert		1.7		0.92	273.23
Standardabw.		0.375			
Median		1.63			
Varianz		0.01251			
Spannweite		1.12-2.42			
Variat.-koeff.		22.05%			

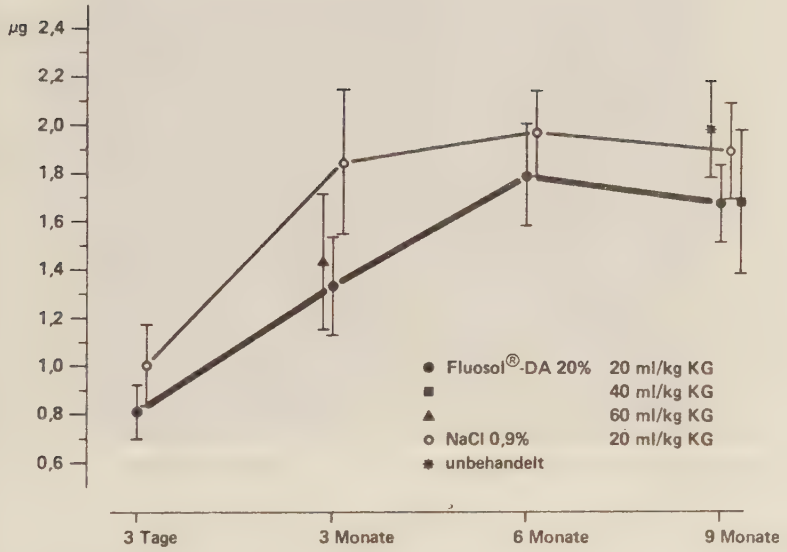
Tabelle 25
Meßwerte für Gruppe 10 (Keine Behandlung)

Tier Nr.	Ext.	HP (µg/mg)	% K	Gewicht Milz (g)	Gesamt-gewicht (g)
91	3.20	1.60	11.936	0.78	453.03
92	3.7	1.85	13.801	0.74	454.03
93	4.0	2.0	14.92	0.86	456.3
94	4.55	2.27	16.934	0.75	433.7
95	4.05	2.02	15.069	0.77	459.8
96	3.7	1.85	13.801	0.7	446.3
97	4.7	2.35	17.531	0.74	488.0
98	3.5	1.75	17.531	0.81	451.9
99	3.75	1.87	13.95	0.86	450.0
100	4.5	2.25	16.785	0.64	442.3
Mittelwert		1.98		0.76	453.53
Standardabw.		0.245			
Median		1.93			
Varianz		0.0539			
Spannweite		1.6-2.35			
Variat.-koeff.		12.37%			

Tabelle 26
Meßwerte für Gruppe 11 (60ml/kg KG Fluosol-DA 20%, Versuchsdauer 3 Monate)

Tier Nr.	Ext.	HP (µg/mg)	% K	Gewicht Milz (g)	Gesamt-gewicht (g)
101	2.00	1.00	7.46	2.0	302.2
102	2.6	1.3	9.968	1.75	295.9
103	2.85	1,42	10.593	1.24	277.3
104	4.0	2.0	14.92	0.81	247.2
105	3.05	1.52	11.339	1.32	296.9
106	2.2	1.1	8.206	1.85	294.2
107	2.7	1.35	10.071	1.62	281.4
108	4.0	2.0	14.92	0.9	279.2
109	2.05	1.02	7.609	1.0	270.3
110	3.55	1.77	13.204	1.3	283.4
Mittelwert		1.45		1.38	282.83
Standardabw.		0.373			
Median		1.38			
Varianz		0.1255			
Spannweite		1.0-2.0			
Variat.-koeff.		25.72%			

Abb. 15



Hydroxyprolinwerte und Standardabweichungen der Milz von 110 Wistarratten über einen Beobachtungszeitraum von 3 Tagen bis 9 Monaten

2. Histologische Untersuchungen

Entsprechend den Veränderungen, wie sie bei der Leber bereits beschrieben waren, fanden sich auch in der Milz speichernde Makrophagen mit Vakuolen als Äquivalente der Fluorocarbonsubstanzen. Die Menge der speichernden Makrophagen ist dosisabhängig und auch die Entspeicherung ist durch Abnahme der Zahl der speichernden Makrophagen deutlich erkennbar. Während man 9 Monate nach der Anwendung von 20 ml Fluosol-DA 20%/kg KG in der Milz keine speichernden Makrophagen mehr erkennen kann (Abb. 16), wird nach einer Verdopplung der Dosis noch eine beträchtliche Zahl von "Schaumzellen" in der Milz vorgefunden (Abb. 17). Die gewebliche Grundstruktur der Milz ist nicht verändert. Bei der Anwendung von 60 ml FDA/kg KG ist nach 3 Monaten erwartungsgemäß eine sehr starke Ablagerung von Makrophagen in der Milz erkennbar, jedoch ist auch in diesen Fällen eine gewebliche Reaktion im Sinne einer Entzündung oder einer Bindegewebsvermehrung lichtmikroskopisch nicht erkennbar.

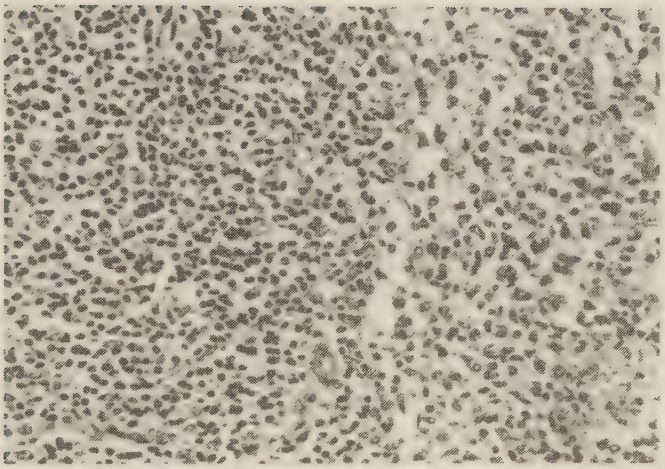


Abb. 16: Milz 9 Monate nach Applikation von 20 ml PFC/kg KG. Keine Speicherzellen in Pulpa oder Follikel nachweisbar. (Paraffin, H-E, Vergr. 360x, Tier Nr. 61)

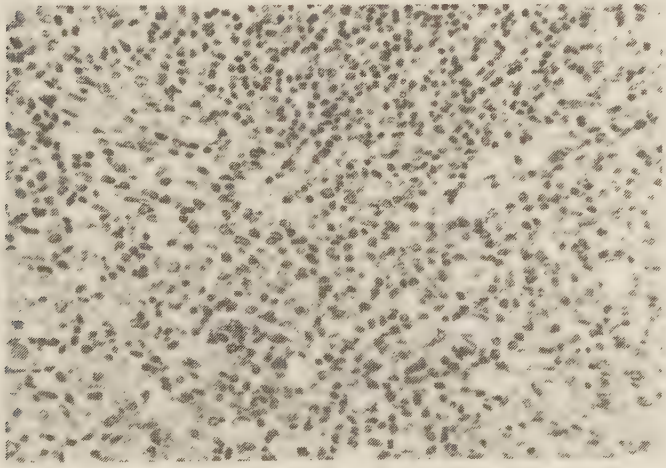


Abb. 17: Milz 9 Monate nach Applikation von 8 g PFC/ kg KG. Zahlreiche Makrophagen parafollikulär. (Paraffin, H-E, Vergr. 360x, Tier Nr. 81)

D. Diskussion

Zur Klärung der Frage, ob nach Fluorocarbonanwendung in der Leber eine Bindegewebsvermehrung stattfindet, ist zur Auswertung der Ergebnisse (Abb. 4–6) der Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander nötig. Hierzu eignet sich der Mann-Whitney-Test für unverbundene Stichproben. Es wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 2 alpha = 0,05 (entspricht 5%) getestet. Die Ergebnisse des Rechenvorganges sind in der Tabelle 27 für die Leber niedergelegt.

Tabelle 27: Gruppenvergleichstest nach MANN-WHITNEY für den Hydroxyprolingehalt der LEBER.

Gruppe	Applikation	Versuchsdauer	Testergebnis	Differenz zur kritischen Testgrenze U=23	Kommentar
1 2	20 ml F-DA 20%/kg KG 20 ml NaCl/kg KG	3 Tage	U = 20	- 3	Bei Gruppe 2 ca. 20% mehr Bindegewebe
3 4	20 ml F-DA 20%/kg KG 20 ml NaCl/kg KG	3 Monate	U = 45	+ 22	kein Unterschied
5 6	20 ml F-DA 20%/kg KG 20 ml NaCl/kg KG	6 Monate	U = 44	+ 21	kein Unterschied
7 8	20 ml F-DA 20%/kg KG 20 ml NaCl/kg KG	9 Monate	U = 37	+ 14	kein Unterschied
8 9	20 ml F-DA 20%/kg KG 40 ml F-DA 20%/kg KG	9 Monate	U = 5	- 17	Bei Gruppe 9 ca. 30 % mehr Bindegewebe
9 10	40 ml F-DA 20%/kg KG Kontrollgruppe	9 Monate	U = 1	- 23	Bei Gruppe 9 ca. 30 % mehr Bindegewebe
8 10	20 ml F-DA 20%/kg KG Kontrollgruppe	9 Monate	U = 29.5	+ 6.5	kein Unterschied
4 11	20 ml F-DA 20%/kg KG 60 ml F-DA 20%/kg KG	3 Monate	U = 25	+ 2	kein Unterschied (vgl. hier aber Diskussion)

Erwartungsgemäß war in allen Versuchsgruppen die histologische Untersuchung kein zuverlässiger Parameter, um eine Bindegewebsvermehrung in den Organen zu erkennen, da die quantitativen Veränderungen offenbar zu klein sind, als daß sie färberisch, bzw. optisch wahrgenommen werden können. Dies entspricht bereits früher gefundenen Ergebnisse (PFANNKUCH und SCHNOY 1982).

Bei dem Gruppenvergleichstest nach Mann-Whitney ist zunächst bemerkenswert, daß der Bindegewebsgehalt der Kontrolltiergruppe nach 3 Tagen Versuchsdauer signifikant höher ist als der der Tiere nach Anwendung des Fluosols. Dies zeigt ein grundsätzliche Problem der Bindegewebsbestimmung nach Infusion oder Injektion von Substanzen, da hierbei ein bereits früher beschriebener Vorgang (vgl. PFANNKUCH u. Mitarb. 1982) zum Tragen kommt: durch die Einwanderung von Makrophagen ins Gewebe gelangt weniger organeigenes Gewebe zur Bindegewebsbestimmung und damit auch weniger Bindegewebe. Somit ergeben sich scheinbar niedrigere Bindegewebswerte in Organen von Tieren nach Fluorocarbonanwendung. Im Verlauf der Monate (Vergleichstest Gruppe 3 und 4, bzw. 5 und 6, bzw. 7 und 8) sind diese Unterschiede im Bindegewebsgehalt nicht mehr erkennbar. Hingegen wird beim Vergleich der Werte für die Leber von Versuchsgruppen, die Fluosol in verschieden hoher Dosierung erhalten hatten, nach 9 Monaten eine deutliche Veränderung im Bindegewebsgehalt festgestellt, der rechnerisch ca. 30% über dem Bindegewebsgehalt bei einfacher Dosierung liegt, wenn die doppelte Dosierung von 40 ml FDA/kg KG angewandt wurde (Vergleichstest 8 und 9).

Ein gleichartiges Ergebnis resultiert auch im Vergleich der Kontrollgruppe mit der Versuchstiergruppe bei doppelter Dosierung (Vergleichstest 9 und 10). Dieses Ergebnis belegt zusammen mit dem Vergleichstest von Gruppe 8 und 10, daß bei einfacher Dosierung von 20 ml FDA-20%/kg KG eine Bindegewebsvermehrung nach einem 9 Monaten nicht festzustellen ist.
Beim Vergleich der Hydroxyprolinwerte der Gruppe 11 und 4 ergibt der Mann-Whitney-Test keinen Unterschied trotz dreimal höherer Dosierung bei Gruppe 11. Die Mittelwerte der Gruppe 11 liegen mit 0,8 ME weit über denen der Gruppe 4. Der Testwert (U = 25) liegt um 2 Punkte über

der kritischen Testgrenze von U = 23. Allerdings liegen ca. 50% beider Werte im gleichen Bereich (vgl. Abb. 4). Diese Tatsache läßt darauf schließen, daß sich Unterschiede im Bindegewebsanteil der Leber, wenn überhaupt, dann erst sehr viel später manifestieren.

Bezüglich der Werte der Bestimmung der Glutamat-Oxalazetat-Transaminase (GOT) ist summarisch festzustellen, daß in keinem Falle ein Unterschied zwischen Versuchstiergruppen und Kontrolltiergruppe festgestellt wurde. Es liegen folglich keine Zeichen einer relevanten chronischen Leberzellschädigung vor.

In Bezug auf die alkalische Phosphatase (AP) sind bei Gruppenvergleichen in zwei Fällen Unterschiede festgestellt worden, die jedoch aufgrund der hohen Standardabweichung nicht auswertbar sind, da beide Gruppen in vollkommen verschiedenen Bereich liegen und deshalb nicht vergleichbar sind (Gruppe 8 und 9 und Gruppe 9 und 10). Wenn beide zu vergleichenden Gruppen in vollkommen verschiedenen Bereichen liegen, ist die Anwendung des Mann-Whitney-Tests nicht sinnvoll, weil zwangsläufig ein Unterschied auftreten muß.

Bezüglich der Milz (Abb. 15) sind die Ergebnisse des Gruppenvergleichstestes in Tab. 28 niedergelegt.

Tabelle 28: Gruppenvergleichstest nach MANN-WHITNEY für den Hydroxyprolingehalt der MILZ.

Gruppe	Applikation	Versuchsdauer	Testergebnis	Differenz zur kritischen Testgrenze U=23	Kommentar
1 2	20 ml F-DA 20%/kg KG 20 ml NaCl/kg KG	3 Tage	U = 23	0	Bei Gruppe 2 findet sich ca. 20% mehr Bindegewebe
3 4	20 ml F-DA 20%/kg KG 20 ml NaCl/kg KG	3 Monate	U = 5.5	- 16.5	Bei Gruppe 4 ca. 27.5% mehr Bindegewebe
5 6	20 ml F-DA 20%/kg KG 20 ml NaCl/kg KG	6 Monate	U = 22.5	- 0.5	Bei Gruppe 6 ca. 10% mehr Bindegewebe
7 8	20 ml F-DA 20%/kg KG 20 ml NaCl/kg KG	9 Monate	U = 27	+ 4	kein Unterschied
8 9	20 ml F-DA 20%/kg KG 40 ml F-DA 20%/kg KG	9 Monate	U = 31.5	+ 8.5	kein Unterschied
9 10	40 ml F-DA 20%/kg KG Kontrollgruppe	9 Monate	U = 24	+ 1	kein Unterschied
8 10	20 ml F-DA 20%/kg KG Kontrollgruppe	9 Monate	U = 35.5	+ 12.5	kein Unterschied
4 11	20 ml F-DA 20%/kg KG 60 ml F-DA 20%/kg KG	3 Monate	U = 24.5	+ 1.5	kein Unterschied (vgl. hier aber Diskussion)

Auch hier findet sich die zunächst paradox erscheinende Situation, daß nach Anwendung von Kochsalz der Bindegewebsgehalt in den Organen höher zu sein scheint. Dieses ist - wie oben ausgeführt (natürlich) - nicht der Fall, sondern durch die vermehrte Mitbestimmung von zellulären Bestandteilen der Makrophagen im Trockengewicht erklärbar. Dieses Phänomen wird auch im Vergleichstest von Gruppe 7 und 8 deutlich, wo rechnerisch der Hydroxyprolingehalt der Versuchstiere 10% unter dem der Kontrolltiere liegt. Das durchschnittliche Milzgewicht der Versuchstiere liegt mit 0,92 g um ca. 20% über dem der Kontrolltiere mit 0,77 g. Folglich muß der Hydroxyprolingehalt der Versuchstiermilz um ca. 16% über dem tatsächlich gemessenen liegen, also statt 1,7 ca. 1,97 betragen. Dieser "bereinigte" Wert liegt um 0,08 ME über dem Wert der Kontrollgruppe von 1,89, was im Mann-Whithey-Test "kein Unterschied" bedeutet. Bei gleichem Vorgehen im Vergleich von Gruppe 9 und 10 liegt das Milzgewicht um ca. 21% über dem der Kontrolltiere und der Hydroxyprolingehalt der Versuchstiermilz müßte daher mit 17% über dem tatsächlich gemessenen, also bei 1,989 liegen. Für diesen Wert gibt der Mann-Whitney-Test "keinen Unterschied" an. Im Vergleich von Gruppe 8 und 10 wird deutlich, daß eine Bindegewebsvermehrung in der Milz nach 9 Monaten bei Anwendung von 20 ml Fluosol-DA 20% nicht festzustellen ist.

Die vorher dargelegte Bereinigung der Hydroxyprolinwerte in Anlehnung an das Organgewicht findet besondere Bedeutung bei Vergleich der Gruppen 4 und 11. Hier ergibt der Mann-Whitney-Test keinen Unterschied. Das Milzgewicht der Versuchstiere liegt mit 1,38 g jedoch um ca. 130% über dem der Kontrolltiere (0,6 g). Folglich muß der Hydroxyprolinwert der Milzen von Versuchstieren um ca. 56% über dem tatsächlich gemessenen liegen, also statt 1,45 ca. 2,26 betragen. Dieser bereinigte Wert liegt mit 0,42 ME über dem mit 1,84 gemessenen Wert der Kontrollgruppe, was im Mann-Whitney-Test einen deutlichen Unterschied ergibt.

E. Zusammenfassung

Die Fluorocarbone sind aufgrund ihrer Transportfähigkeit für Blutgase in standardisierten Emulsionen (Fluosole^{R}) zur parenteralen Anwendung geeignet.

In der vorliegenden Arbeit wird geprüft, ob nach parenteraler Anwendung des Fluosol-DA 20% im Tierversuch eine chronische Organschädigung an Leber und Milz eintritt. Da in früheren Untersuchungen chronisch entzündliche oder sonstige schädigende Faktoren mikroskopisch nicht sichtbar waren, wurde als möglicher weiterer Parameter einer chronischen Organschädigung (chronischen Organreizung) der Bindegewebsgehalt untersucht und zur Bindegewebsbestimmung die Hydroxyprolinmethode angewandt. Bei den Versuchen wurde besonders auf die Einhaltung statistischer Forderungen für eine zuverlässige Aussage geachtet. Die gefundenen Ergebnisse wurden im Gruppenvergleichstest (Mann-Whitney) geprüft. Es wurde festgestellt, daß im beobachteten Zeitraum von 9 Monaten bei der (auch für eine mögliche Anwendung am Menschen in Frage kommenden) Dosierung von 20 ml Fluosol-DA 20%/kg KG (entspricht 4 g Fluorocarbonsubstanzen) eine Bindegewebsvermehrung in der Leber und in der Milz nicht auftritt. Aus den Untersuchungen geht weiterhin hervor, daß bei Verdopplung der Dosierung (Versuchszeitraum 9 Monate) eine Bindegewebsvermehrung in der Leber festzustellen ist, während die Milz noch keine Veränderungen der Werte zeigt.

Nach dreifacher Dosierung (60 ml Fluosol-DA 20%/kg KG) deuten die Ergebnisse auf eine erhebliche Zunahme des Bindegewebes in Leber und Milz hin, wobei der beobachtete Zeitraum von drei Monaten im Hinblick auf die spätere Entspeicherung und damit auch auf eine mögliche Senkung des erhöhten Bindegewebsgehaltes der Organe eine abschließende Beurteilung nicht zuläßt.

Die Ergebnisse werden mit dem histologischen Bild der beiden Organe korreliert und schließlich die Resultate der Serumuntersuchungen (GOT, AP) dargelegt und diskutiert.

Aus den vorliegenden Untersuchungen kann nicht abgeleitet werden, daß nach einem längeren Zeitraum der Entspeicherung von den Substanzen auch die Bindegewebsvermehrung wieder reversibel sein könnte.

7. Literatur

Burkhardt H, Burkhardt F, Wepler R, Rommel K (1974)
Automatische und manuelle Hydroxyprolinbestimmung im Urin.
Z Klin Chem Klin Biochem 12: 108-115

Clark LC, Gollan F (1966)
Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure
Science 152: 1755-1756

Geyer RP (1975)
Potential use of artificial blood substitutes
Fed Proc 34: 1525-1528

Geyer RP (1982)
Recent development in research with perfluorochemical artificial blood substitutes
5th Int Symp on PFC Blood Substitutes: 19-29

Grant RA (1964)
Estimation of hydroxyproline by auto-analyzer
J Clin Path 17: 685-686

Hartmann T (1982)
Tierexperimentelle Untersuchungen zur Frage chronischer Organveränderungen nach parentaler Anwendung von Fluorkohlenwasserstoffen (Fluorokarbonen)
Inaugural-Dissertation, FU Berlin

Hoffarth C (1982)
Lichtmikroskopische Untersuchungen bei parenteraler Anwendung von Fluorocarbonen (Fluosol-43, Fluosol-DA 20%, Fluosol-DA 35%) nach einmaliger und mehrmaliger Injektion im Tierexperiment
Inaugural-Dissertation FU Berlin

Kivirikko KJ, Laitinen O, Prockop DJ (1967)
Modifications of specific assay for Hydroxyproline in urine.
Analyt Biochem 19: 249

Masuda M, Hori M, Ohyanagi H, Kusonoki T, Mitsuno T (1973)
Pathological findings of rats after infusion of fluorocarbon emulsion
Proc II. Intercomp Conf on Fluorocarbon: 217-228

Naito R, Yokoyama K (1977)
Improvement of perfluorodecalin emulsion with special regard to in vivo stability, offering Fluosol-DA
HS Symp Res on PFC in Med and Biol: 42-92

Naito R, Yokoyama K (1981)
Perfluorochemical blood substitutes "FC-43 emulsion", "Fluosol-DA, 20% and 35%" for preclinical studies as a candidate for erythrocyte substitution -Supplement-
The Green Cross Corporation, Osaka (Japan)
Tech Inf Ser Nr 5

Neumann RE, Logan MA (1950)
The determination of hydroxyproline
J Biol Chem 184: 229-241

Öhlschlegel Ch, Schnoy N, Hoffarth C, Hartmann T (1982)
Light- and electronenmicroscopic findings after repeated application of Fluosol-DA 20% and Fluosol-35% in rats.
5th Int Symp on PFC Blood Substitutes: 68-72

Pfannkuch F, Schnoy N, Multier-Lajous A (1977)
Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen über Aufnahme, Transport, Ablagerung und Ausscheidung von Fluorocarbonverbindungen im Rattenorganismus
Verh Dtsch Ges Path 61: 471

Pfannkuch F, Schnoy N (1979)
Verbleib des blutgastransportierenden Fluorkohlenwasserstoffes Fluorocarbon-43 im Organismus bei parenteraler Anwendung im Tierversuch
Anaesthesist 28: 511-516

Pfannkuch F, Schnoy N, Öhlschlegel C, Wilson C (1982)
Comparative morphological studies in animal experiments after parenteral use of Fluosol-43, -DA 20% and -DA 35%
5th Int Symp on PFC Blood Substitutes: 61-67

Pfannkuch F, Schnoy N (1982)
Morphologische und biochemische Untersuchungen nach Anwendung zweier Perfluorkohlenwasserstoffe (Fluosol-DA 20% und -DA 35%) im Tierexperiment
Verh Dtsch Ges Path 66: 613

Pfannkuch F, Schnoy N (1983)
Long-term observation of PFC storage in organs of rats after various dosages
Progr Clin and Biol Res 122: 209-218

Pfannkuch F (1983)
Parenterale Anwendung perfluorierter Kohlenwasserstoffe (Fluorocarbone) - zur Pathologie des "künstlichen" Blutes
Habilitationsschrift im Fachbereich 03 der Freien Universität Berlin

Prockop DJ, Udenfriend S (1961)
A simple technique for measuring specific activity labeld hydroxyproline in biological materials.
J of Biol Chem Baltimore 236: 1395-1398

Prockop DJ, Kivirikko KJ (1967)
Relationship of hydroxyproline excretion in urine to collagen metabolism - biochemistry and clinical applications.
Ann Int Med 66: 1243

Sandritter W, Beneke H (1978)
Allgemeine Pathologie
Schattauer FK Stuttgart, New York

Sloviter HA, Kamimoto T (1967)
Erythrocyte substitute for perfusion of brain
Nature 216: 458–460

Stegemann H (1958)
Mikrobestimmung von Hydroxyprolin mit Chloramin-T und p-Dimethylamino-benzaldehyd.
Hoppe-Seylers Z Physiol Chem 311: 41–45

Schneider M, Hauk H, Förster H, Hübner K (1978)
Morphologische Untersuchungen der Organveränderungen nach Infusion verschiedenartiger perfluorierter Kohlenwasserstoffe bei Ratten
Verh Dtsch Ges Path 62: 312–315

Schneider M, Hauk H, Hoffmann H, Förster H, Hübner K (1977)
Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen der Organveränderungen nach Gabe synthetischer Sauerstoffträger (Fluorkohlenwasserstoffverbindungen)
Verh Dtsch Ges Path 61: 381

Schnoy N, Pfannkuch F (1980)
Elektronenoptische Untersuchungen zur Fluorocarbon-Ausscheidung und Aufnahme in der Lunge
Virch Arch B Cell Path 34: 269–276

Yokokyama K, Naito R, Tsuda Y, Fukaya C, Watanabe M, Hanada S, Suyama T (1983)
Selection of 53 PFC substances for better stability of emulsion and improved artificial blood substitutes
Progr Clin and Biol Res 122: 189–194

G. Danksagung

Herrn Prof. Dr. S. Blümcke danke ich für die Überlassung des Themas der Arbeit und die freundliche Unterstützung.

Herrn Priv.-Doz. Dr. F. Pfannkuch danke ich für die umfassende Betreuung der Arbeit.

Herrn Dr. Ch. Grosse-Siestrup danke ich für die Beratung und Unterstützung bei den Tierversuchen.

Frau Dipl.-Math. R. Plättke danke ich für ihre wertvolle Unterstützung bei der Wahl der statistischen Methoden und für die Beratung.

Frau A. Zikoll habe ich zu danken für die Durchführung der Blutserumuntersuchungen (KCZ des Klinikums Charlottenburg; Dir.: Prof. Dr. E. Köttgen).

Frau R. Ludloff danke ich an dieser Stelle für die Bestimmungen am Autoanalyzer (Department für Klinische Chemie der Universität Ulm; Komm. Leiter: Priv.-Doz. Dr. V. Meier).

Den Damen A. Popp, B. Ossa und B. Finkelde danke ich für die Anfertigung der histologischen Präparate.

Frau I. Weißleder hat bei der Versuchsdurchführung und anschließenden Aufbereitung der Gewebsproben mitgeholfen, ich möchte ihr hiermit vielmals danken.

Frau B. Kraft danke ich für die Ausführung der Schreibarbeiten.

H. Lebenslauf

Am 6. 10. 1950 wurde ich als erstes Kind der Eheleute Willi Lutz und Annemarie, geborene Stiegel in Heilbronn geboren. Vom April 1957 an besuchte ich die Eduard Mörike Grundschule in Heilbronn. Im April 1960 wechselte ich in das Robert Mayer Gymnasium über und bestand im Juni 1971 die Reifeprüfung.

Nach dem Abitur war ich als Pfleger im Landeskrankenhaus Weinsberg tätig. Innerhalb dieser Zeit legte ich die Prüfung zum Pflegehelfer ab.

Ab Oktober 1973 studierte ich an der Albert Ludwig Universität Freiburg Volkswirtschatfslehre und beendete das Studium im September 1977 mit der Diplomarbeit.

Nach dem Tode meines Vaters im Jahre 1975 übernahm ich die Führung des elterlichen Betriebes.

Mit Beginn des Wintersemesters 1977/78 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin auf. Am 26. 8. 1980 bestand ich das Physikum, am 27. 8. 1981 den ersten, am 12. 9. 1983 den zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung. Anschließend war ich als Student im praktischen Jahr im Krankenhaus am Urban in Berlin-Kreuzberg tätig.

Den dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung legte ich am 26. 11. 1984 erfolgreich ab.

Die Approbation zum Arzt erhielt ich am 14. 12. 1984.

Papyrus-Druck GmbH Berlin ☎ 3416451
Dissertationen